



L
2 y

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGIA

CULTIVO in vitro DE OVULOS NO FECUNDADOS
DE PAPAYA (Carica papaya L.)

T E S I S

Que para obtener el título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

MARIA CONCEPCION ACOSTA RODRIGUEZ

FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	PAGINA
LISTA DE FIGURAS Y CUADROS.....	iii
LISTA DE APENDICES.....	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS.....	3
REVISION DE LITERATURA	
1. Generalidades de la papaya (<u>Carica papaya</u> L.).....	4
1.1. Origen y distribución geográfica	5
1.2. Clasificación y descripción botánica	8
1.3. Usos e importancia	10
1.4. Cultivo y problemática	10
2. Cultivo de tejidos vegetales	12
2.1. Generalidades	14
2.2. Iniciación y mantenimiento de cultivo de callos	17
2.3. Cultivo de óvulos no fecundados	19
2.4. Importancia de la obtención de haploides	20
2.5. Cultivo de tejidos vegetales en papaya	
(<u>Carica papaya</u> L.)	20
2.5.1. Inducción de callo	23
2.5.2. Embriogénesis somática	25
2.5.3. Organogénesis	25
MATERIALES Y METODOS	
1. Material vegetativo	27
2. Medios de cultivo	27
3. Condiciones de incubación	29
4. Establecimiento del cultivo.....	
4.1. Colecta y desinfección del material vegetal	33
4.2. Siembra de óvulos	34
5. Diferenciación de callo	34
6. Diseño experimental	34
7. Análisis de resultados	35

	PAGINA
RESULTADOS Y DISCUSION	
1. Inducción de callo	36
2. Diferenciación de callo	51
CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFIA	56
APENDICES	60

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURAS	PAGINA
1. Efecto del ácido indol-butírico (AIB) y bencil-amino-purina (BAP) en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (<u>Carica papaya L.</u>), cultivados en medio Murashige & Skoog (MS) y White (WH) e incubados en luz y oscuridad	38
2. Efecto del ácido indol-butírico (AIB) y cinetina (Kn) en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (<u>Carica papaya L.</u>), cultivados en medio Murashige & Skoog (MS) y White (WH) e incubados en luz y oscuridad	39
3. Efecto del ácido 2,4-dicloro-fenoxi-acético (2,4-D) y cinetina (Kn) en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (<u>Carica papaya L.</u>), cultivados en medio Murashige & Skoog (MS) y White (WH) e incubados en luz y oscuridad	41
 CUADROS	
1. Constituyentes inorgánicos del medio Murashige & Skoog (1962) y White (1963)	30
2. Componentes orgánicos utilizados en los medios de cultivo (mg/l).....	31
3. Tratamientos para la inducción de callo de óvulos no fecundados de papaya (<u>Carica papaya L.</u>).....	32
4. Diferentes concentraciones de ác. naftalen-acético y bencil-amino-purina utilizadas en la diferenciación de callos de óvulos no fecundados de papaya	33
5. Efecto de reguladores del crecimiento (AIB/BAP), medios de cultivo (MS y WH) y condiciones de incubación (luz y oscuridad) en la formación de callo <u>in vitro</u> de óvulos no fecundados de papaya	43
6. Efecto de reguladores del crecimiento (AIB/Kn), medios de cultivo (MS y WH) y condiciones de incubación (luz y oscuridad) en la formación de callo <u>in vitro</u> de óvulos no fecundados de papaya.....	45

	PAGINA
7. Efecto de reguladores del crecimiento (2,4-D/Kn), medios de cultivo (MS y WH) y condiciones de incubación (luz y oscuridad) en la formación de callo <u>in vitro</u> de óvulos no fecundados de papaya	46

LISTA DE APENDICES

1. Análisis de varianza para los factores AIB, BAP, MC y CI en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (<u>Carica papaya</u> L.) cultivados <u>in vitro</u>	61
2. Análisis de varianza para los factores AIB, Kn, MC y CI en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (<u>Carica papaya</u> L.) cultivados <u>in vitro</u>	62
3. Análisis de varianza para los factores 2,4-D, Kn, MC y CI en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (<u>Carica papaya</u> L.) cultivados <u>in vitro</u>	63
4. Prueba de Tukey para los factores AIB, BAP, medios de cultivo (MC) y condiciones de incubación (CI) en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (<u>Carica papaya</u> L.).....	64
5. Prueba de Tukey para los factores AIB, Kn, medios de cultivo (MC) y condiciones de incubación (CI) en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (<u>Carica papaya</u> L.)	65
6. Prueba de Tukey para los factores 2,4-D, Kn, medios de cultivo (MC) y condiciones de incubación (CI) en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (<u>Carica papaya</u> L.)	66

RESUMEN

Se analizó la influencia de concentraciones de reguladores del crecimiento, medios de cultivo y condiciones de incubación en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya cultivados in vitro.

Se probaron dos medios de cultivo para la iniciación de callo. Uno constituido por las sales minerales del medio Murashige & Skoog (MS) y el otro constituido por las sales minerales del medio White (WH), complementados con tiamina (0.4 mg/l), inositol (100 mg/l) y sacarosa (30 y 20 g/l respectivamente). Ambos medios fueron adicionados con combinaciones de reguladores del crecimiento: ácido indol-butírico y bencil-amino-purina (AIB/BAP); ácido 2,4-dicloro-fenoxi-acético y bencil-amino-purina (2,4-D/BAP); ácido indol-butírico y cinetina (AIB/Kn) y ácido 2,4-dicloro-fenoxi-acético y cinetina (2,4-D/Kn) en concentraciones de 0.0, 0.5 y 5.0 micromoles/l tanto para auxinas como para citocininas. Para las condiciones de incubación se probaron: luz (fotoperíodo de 16 h luz por 8 h de oscuridad) y oscuridad, para cada combinación de fitoreguladores.

En todas las relaciones de reguladores del crecimiento probadas se obtuvieron porcentajes bajos de formación de callo. La mayoría de éstos estuvieron solamente en la superficie del óvulo.

La inducción de callo para la relación AIB/BAP se obtuvo en 0.5 micromoles/l de AIB y, 0.0 y 0.5 micromoles/l de BAP en medio WH, tanto en luz como en oscuridad. Cuando se probó el AIB con Kn, se observó que los mejores tratamientos para la inducción se encontraron en 0.5 micromoles/l de AIB y 0.0 y 0.5 micromoles/l de Kn, cultivados en medio WH o MS, y en condiciones de oscuridad. En esta relación se obtuvo el mejor tratamiento el cual consistía de 0.5 micromoles/l de AIB y Kn, cultivados en medio MS e incubados en condiciones de oscuridad, la respuesta fue de 100% con callos grandes y de consistencia friable. Cuando se trabajó con 2,4-D y Kn

se encontró que niveles de 0.5 y 5.0 micromoles/l de la auxina y 0.5 micromoles/l de la citocinina, en medio WH y en condiciones de obscuridad, los mejores tratamientos para la inducción de callo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican que los requerimientos necesarios para la inducción de callo in vitro de óvulos no fecundados de papaya son una compleja relación entre medios de cultivo, tipo y concentraciones de reguladores del crecimiento, condiciones de incubación y del material madre.

La diferenciación de los callos no se logró en ninguna de las 36 combinaciones de ANA y BAP probadas.

INTRODUCCION

A pesar que la papaya es uno de los frutos tropicales más cosechados, su cultivo presenta varios problemas. Uno de ellos es su forma de propagación por semilla, que da lugar a que algunas de las características hereditarias importantes para la producción se pierdan (Allan, 1964), y aunque permite obtener gran cantidad de material vegetal, éste no garantiza, debido a la heterogeneidad genética y a la diversidad floral que presenta la especie, ser productivo con frutos de calidad comercial. Sin embargo, se han hecho esfuerzos por desarrollar métodos de propagación asexual empleando los sistemas tradicionales de injerto y enraizamiento de estacas, pero no se han tenido resultados favorables, por lo que el mantenimiento de individuos con características agronómicas importantes es un imposible (Rajeevan y Pandey, 1986).

Por otro lado, las plantaciones son afectadas por enfermedades, sobre todo virales, que disminuyen la produc-

ción y la calidad del producto. La carancia de un método de reproducción asexual que incremente los clones resistentes o tolerantes, así como por falta de programas de mejoramiento genético dificultan el control de tales enfermedades (Litz, 1984).

La problemática descrita y los resistentes logros alcanzados mediante el manejo de las técnicas de cultivo de tejidos en gran cantidad de especies, han dado lugar a la utilización de aquellos como posible alternativa para la propagación y mejoramiento genético de la papaya (Litz y Conover, 1982).

Uno de los logros más significativos del empleo -- del cultivo de tejidos vegetales con fines de fitomejoramiento, lo constituye la obtención de individuos haploides, ya sea para estudios de inducción de mutagénesis o para la producción de plantas homocigóticas (Reinet y Bajaj, 1977). La técnica generalmente involucrada con éste propósito es la inducción de androgénesis en anteras o granos de polen; pero si bien esto ha sido reportado para papaya, sus resultados han sido pobres: un individuo haploide de cada mil anteras cultivadas (Litz, 1984).

El poco éxito alcanzado hasta el momento hace necesaria la búsqueda de un medio alternativo para estos fines. Una opción es el cultivo de óvulos no fecundados, técnica que ya ha sido utilizada en varias especies (Yang y Zhou, 1982).

El presente trabajo tuvo como objetivos analizar la influencia de medios de cultivo, concentraciones de reguladores del crecimiento y condiciones de incubación en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya cultivados in vitro e inducir la diferenciación de los callos.

REVISION DE LITERATURA

1. Generalidades de la papaya (Carica papaya L.).

1.1. Origen y distribución geográfica.

Mucho se ha discutido sobre el origen de la papaya, sin embargo, la mayoría de los autores modernos asignan su origen a Centroamérica. Sin duda, dicha discusión se debió a rápida dispersión que tuvo desde su centro de origen, por su tipo de propagación por semilla, su rápido crecimiento y su adaptación a variadas condiciones de suelo. Se conoce como papaya a la planta y fruto de Carica papaya L. (Alonso, 1953).

La papaya se encuentra ampliamente distribuida en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, desde el nivel del mar hasta los 1500 m de altitud, y entre latitudes de 32° N y 32° S (Moreno, 1980). Los primeros países en producción son Brasil, Indonesia, India, México y Zaire (Samson, 1986). En el país se encuentra en 18 estados, pero el 80% de la superficie se localiza en tres de ellos: Veracruz,

Guerrero y Jalisco, siendo el primero el más importante por su producción y superficie cosechada (SARN, 1983).

1.2. Clasificación y descripción botánica.

La papaya ha sido clasificada botánicamente de la siguiente manera, según Cronquist (1981):

REINO	Phyta (Plantae)
DIVISION	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Dilleniidae
ORDEN	Violales
FAMILIA	Caricaceae
GENERO	<u>Carica</u>
ESPECIE	<u>C. papaya</u> L.

La familia Caricaceae tiene sólo 4 géneros, tres americanos y uno africano, con 31 especies en total. El género Carica cuenta con 22 especies, dos de ellas presentes en México: C. papaya y C. cauliflora (Moreno, 1980).

La papaya (Carica papaya L.) es una planta herbácea arborecente de crecimiento rápido, de 3 a 8 m de altura. Tallo monopódico, suculento, meduloso; follaje densamente concentra

do en el ápice, generalmente sin ramas, corteza verde o grisácea, lisa y con numerosas cicatrices foliares horizontales. Las hojas son lobadas, de envés más pálido, con lóbulos hendidos hasta cerca de la nervadura; palminervias, con pecíolos largos, fistulosos, algunas veces pubescentes. Las inflorescencias se localizan en las axilas de las hojas superiores; las masculinas consisten a menudo de varias agrupaciones cimosas de flores a lo largo del raquis, brácteas lanceoladas y hasta 100 flores. El cáliz de las flores estaminadas es campanulado a rotado, corola blanca, crema o amarillenta; con 10 estambres, los superiores de anteras basifijas, oblongas y los inferiores de anteras dorsifijas, oblongas. Las inflorescencias femeninas son pequeñas, a menudo reducidas a una flor con pedúnculo de 2 cm o menos de largo; cáliz rotado o campanulado, de corola blanca o amarillenta, ovario unilocular, elipsoide de 1 a 3 cm de largo, el estilo de 2 a 4 mm de longitud y el estigma de 4 a 10 mm de largo. El fruto es una baya ovoide, amarillenta o anaranjada hasta verdosa, de 2 a 10 cm de longitud y de 1.2 a 6 cm de ancho (Badillo, 1971).

Las formas florales descritas son aplicables a la papaya silvestre que, por lo general, es dioica. La papaya cultiada presenta frecuentemente una gran variedad de tipos de flores hermafroditas, además de las típicas masculinas y femeninas, Storey (1937) las describe por tipos:

Tipo I. La flor típica pistilada.

Tipo II. Flor hermafrodita modificada del tipo I, llamada para algunos "pentandria". Presenta pétalos unidos en la base con 5 estambres alternos. Los pétalos están ligeramente connados en la base, así como ligeramente más adnados al gineceo, que las del tipo I. El gineceo de estas flores, como las del tipo I, presenta 5 carpelos; los lóbulos son más profundos y los estambres se encuentran situados a lo largo del surco. Frutos ovoides.

Tipo III. Parece ser una transición hermafrodita entre el tipo II y el IV. Designada por otros autores como "intermedia". Los pétalos se encuentran unidos en la base o hasta la mitad de su longitud; el número de estambres es de 2 a 10, y su estado de adnación al gineceo o a la corola se puede considerar variado. El gineceo está frecuentemente malformado y la fusión de los carpelos, de los cuales el número puede variar de 5 a 10, no se logra en su totalidad, por lo que el ovario está abierto. Los frutos que se desarrollan de tales flores son usualmente deformes.

Tipo IV. Flor hermafrodita llamada "elongata". Los pétalos están fusionados en tres cuartas partes de su longitud. Con 10 estambres en dos series en el cuello del tubo, 5 de ellos están opuestos a los lobulos de la corona y subsésiles.

Tipo V. Típica flor estaminada.

Los frutos de la papaya cultivada alcanzan tamaños de 30 a 60 cm de largo y de 20 a 40 cm de ancho, con pericarpios de hasta 2.5 cm de espesor, pulpa amarilla o anaranjada succulenta. Las semillas son numerosas, de más o menos 4 mm de largo por 2 mm de ancho en estado seco; la sarcotesta es mucilaginoso, y la endotesta de aspecto arrugada de color café; los 2 cotiledones presentan tenues nervaduras en la base. El número cromosómico es $2n=18$ (Alonso, 1953).

La papaya es una especie polígama, produciendo al mismo tiempo más de una clase de flores como las señaladas, y además flores que no presentan las formas básicas. Esta tendencia parece ser determinadas por factores climáticos como disminución de la humedad atmosférica y variaciones de la temperatura (Lange, 1960).

1.3. Usos e importancia.

La papaya es una planta cuyas características vegetativas; la facilidad con que se propaga por semilla, su rápido crecimiento, la pronta y abundante fructificación, la hacen ser muy apreciada para quienes la cultivan (Alonso, 1953). Por ello, es uno de los principales cultivos tropicales (Litz, 1984).

Se le utiliza para consumo como fruta fresca y en la elaboración de refrescos, helados, dulces, batidos, jaleas y mermelada.

das (Alonso, 1953). La papaya contiene: 85% de agua, 10 a 13% de azúcares, 0.6% de proteína y vitaminas A, B₁, B₂ y C (SARH, 1983).

Además de su extraordinaria producción de frutos, la papaya es también fuente de sustancias químicas, que son extraídas del latex que contienen los frutos inmaduros. La papaína, enzima proteolítica, es obtenida del látex secado al sol; es usada en la industria como ablandador de carnes, como aclarador de cerveza, en la elaboración de jabones y cosméticos, para macerar fibras de lana y algodón, y para el curtido de pieles. En medicina es utilizada para tratar infecciones digestivas. Del latex es obtenida también la carpaína, alcaloide que se utiliza como depresico cardiaco, amibfático y diurético (Ibar, 1979; Litz, 1984). En el país, el 71% de la producción destinada al mercado nacional es consumida en fresco y el 29% se industrializa (SARH, 1983).

México ha sido uno de los principales productores de papaya. En el período que comprende los años de 1976-1980 fue el segundo productor (Guevara, 1986), mientras que en 1984 ocupó el cuarto lugar con 300 mil toneladas; esto muestra la decadencia que ha sufrido el cultivo debido a problemas fitosanitarios, principalmente por virosis, que no sólo ha causado disminución en la producción, sino también en la superficie cosechada. La exportación es muy baja, ya que sólo el 7% de la producción to-

tal se exporta, principalmente a Estados Unidos (SARH, 1983).

1.4. Cultivo y problemática.

El método de propagación de la papaya es por semilla. Para establecer una plantación se procede a sembrarlas previamente en semillero para su germinación, la cual sucede aproximadamente en dos semanas. Las plántulas son llevadas al campo cuando han alcanzado de 10 a 15 cm de longitud, alrededor de 6 semanas después, para ser sembradas definitivamente. La densidad de plantación varía de 1000 a 2000 plantas por hectárea, con espacios de 3 x 3 m a 2.5 x 2 m, colocando de 3 a 4 plántulas por hoyo. El sexo de la planta sólo se sabe al florecer, entre 4 a 5 meses después de la siembra en el campo, por lo que en este momento se procede a eliminar las plantas masculinas, dejando una por cada 15 femeninas para que actúen como polinizadoras (Ibar, 1979; Samson, 1986). Los frutos maduros están listos para cosecharse de 10 a 12 meses después de la germinación de la semilla (Ochse, 1976).

La eliminación de las plantas masculinas al momento de la floración (aproximadamente el 50% de las plántulas sembradas), hacen a éste sistema poco eficiente. Además, la diversidad floral que presenta, ocasiona una reducción del rendimiento, debido a las formar hermafroditas que son temporalmente inactivas o producen frutos deformes no comerciales (SARH, 1983). Todo esto, junto con la dificultad de mantener los tipos deseados, lleva a

obtener individuos de calidad y productividad inferior.

La importancia de la herencia del sexo en este cultivo lleva a genetistas a estudiar su control mediante cruza dirigidas durante un periodo prolongado de años; como resultado obtienen que el caracter sexual está controlado por un gen con tres alelos. Dichas cruza resultan en la práctica complicadas.

En papaya se han probado otros métodos de propagación, utilizando los sistemas tradicionales de propagación vegetativa, el injerto y el enraizamiento de esquejes. Dichos sistemas son empleados para mantener las características fenotípicas importantes y poder lograr plantaciones uniformes con rendimientos altos. Aunque se han tenido resultados favorables, aún no están totalmente desarrollados y su aplicación resulta muy costosa (Allan, 1964).

Traub y Marshall (1937) lograron enraizar esquejes en menos de un mes sobre camas calientes en invernadero, bajo condiciones de temperatura y humedad controlada, obteniendo 50% de enraizamiento contra 27.7% del control, con un promedio de 25 a 12 raíces respectivamente al ser remojadas con ácido indolacético. Jiménez (1957), con el fin de obtener individuos que fueran resistentes al virus de la mancha anular con frutos aceptables comercialmente (*C. papaya* x *C. cauliflora*), realizó injertos entre algunas especies de Carica, y observó que se injertan con facili

dad teniendo gran crecimiento vegetativo.

El problema prioritario que limita la producción en la mayor parte de las regiones productoras del mundo, son las enfermedades causadas por virus, principalmente el virus de la mancha anular, el cual ha causado daños severos en las plantaciones (Litz, 1984).

En México, la enfermedad causada por el virus de la mancha anular adquirió importancia económica a partir de 1974 en las costas del Golfo de México y, al igual que en todo el mundo, actualmente se considera la primera limitante de la producción (SARH, 1983).

2. Cultivo de tejidos vegetales.

2.1. Generalidades.

El concepto de cultivo de tejidos vegetales denota genéricamente todo cultivo in vitro de células, tejidos y órganos (Murashige, 1979) bajo condiciones de asepsia, en un medio artificial e incubados en una cámara de crecimiento con ambiente controlado (luz, temperatura, fotoperíodo, etc.).

Murashige (1979) establece que los principales componentes de un medio de cultivo pueden agruparse en : (1) sales inorgáni-

cas, (2) sustancias orgánicas, (3) compuestos no definidos de origen natural, y (4) materiales inertes de soporte. Sin embargo, varios factores son fundamentales en el éxito de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales como establecer un cultivo aséptico; esto se logra esterilizando medios de cultivo, instrumentos necesarios y la desinfección del material vegetal (éste varía de acuerdo a la especie a las condiciones en que se desarrolla la planta donadora y al tipo de tejido). La concentración y el balance de los dos tipos de hormonas más comunmente empleados (auxinas y citocininas) presentan un papel muy importante en la respuesta in vitro, que hace posible dirigir el desarrollo del tejido produciendo diferentes respuestas morfogénicas.

Como los requerimientos nutricionales para el crecimiento óptimo dependen de la especie vegetal y del tipo de material que se desea cultivar, no existe a la fecha un medio de cultivo satisfactorio de uso general. La complejidad del medio aumenta a medida que disminuye el tamaño de la parte vegetal que se desea cultivar (Thorpe, 1981).

Las condiciones fisiológicas de la planta donadora influirán en la respuesta in vitro. Si las plantas han estado cultivadas en condiciones controladas, será más fácil su respuesta en comparación con el material proveniente de plantas crecidas en el campo (Naftali, 1985).

Dependiendo del tipo de material vegetal cultivado, las aplicaciones de estas técnicas son : del cultivo de meristemas, se logra la propagación clonal, la obtención de plantas libres de virus y la conservación de germoplasma; del cultivo de anteras, polen y óvulos, la obtención de mutantes y plantas haploides; del cultivo de células en suspensión, la selección de mutantes, variantes y la producción de metabolitos secundarios; del cultivo de protoplastos, la selección de mutantes, hibridación somática e ingeniería genética (Naftalí, 1985). Las técnicas de cultivo de tejidos han servido, y son muy importantes, para la realización de estudios bioquímicos, fisiológicos y genéticos (De Fossard, 1977).

2.2. Iniciación y mantenimiento del cultivo de callos.

El callo consiste en una masa desorganizada de células parenquimatosas que surgen de la proliferación de células del tejido progenitor.

La inducción de callo de una parte de la planta ocurre cuando el explante estéril es puesto en contacto con el medio nutritivo conocido y promueve la división celular. Existen explantes que contienen una variedad de tipos celulares diferentes, que podrían producir un callo mixto, sin embargo, puede ser que un solo tipo de tejido comience la división y que el callo sea homogéneo. La división comienza en un instante y en

una minoría de la población. El tamaño y forma del explante inicial no es normalmente importante, sin embargo, la proliferación puede faltar completamente con explantes de tamaño crítico (explantes de mayor tamaño responden más fácilmente) (Yeoman y Macleod, 1977).

Los medios de cultivo más usados para la obtención de callos son el Heller, el Murashige y Skoog, y el White, tanto en forma básica como modificada. El tejido puede requerir para su respuesta, de un medio de cultivo que contenga tanto auxinas como citocininas, o una de las dos. Las auxinas normalmente usadas en la iniciación y mantenimiento de cultivo de callos son: AIA en concentraciones de 0.1 a 10 micromoles/l, ANA es usado en altas concentraciones y el 2,4-D de 0.1 a 10 micromoles/l. La citocinina comúnmente empleada es la Kn (Yeoman y Macleod, 1977).

Los callos necesitan ser subcultivados cada 4 a 6 semanas para su preservación, así se evita la desecación del medio y la acumulación de metabolitos del tejido. Los callos requieren ser subdivididos al resementarlos en medio nutritivo fresco.

El curso del desarrollo de un callo de un fragmento de tejido, puede estar dividido en tres estados: inducción, división y diferenciación. Estos pueden ser caracterizados por cambios metabólicos que sufren a lo largo del proceso.

En la fase de inducción, las células se preparan a dividirse; la actividad metabólica y el tamaño celular permanecen constantes. La duración de esta fase varía de acuerdo a las condiciones fisiológicas de las células del explante inicial y de las condiciones de cultivo empleadas. Esto es seguido por una fase de actividad sintética y una reducción del tamaño celular, iniciado por la ocurrencia de división celular en el estrato superficial del explante. Durante esta fase de división se dan cambios regresivos, involucrando un progresivo retorno a un estado meristemático o de dediferenciación, que tiene como resultado la formación de un patrón particular de crecimiento. El rasgo distintivo de esta fase, es que la división ha procedido por todas las regiones exteriores del callo, dejando un centro pequeño de células sin dividir.

Para establecer cómo una célula quiescente puede activarse e inducir la división es necesario comparar el estado estructural y metabólico de tales células antes y después de la inducción. Así, es necesario entender cómo los reguladores del crecimiento inician la división celular. Hay mucha información sobre los cambios que acompañan la adición de reguladores del crecimiento en tejidos vegetales, pero los mecanismos de acción de estos compuestos no son conocidos (Aitchison, Macleod y Yeoman, 1977).

A finales de la fase de división aparece otra secuencia

morfogénica: la formación de nódulos meristemáticos. Esta es una característica común en el desarrollo de cultivo de callos, y dichos centros pueden comenzar la formación de brotes, raíces o incipientes embriones. La citodiferenciación ocurre en forma de elementos traqueales, elementos cribosos, células suberizadas, células secretoras y tricomas (Thorpe, 1981).

Los callos pueden ser compactos y completamente duros, o friables y desintegrables manualmente o en agitación. En general se menciona que altos niveles de auxinas y bajos de citocininas dan lugar a un callo desmenuzable y viceversa (Aitchison, Macleod y Yeoman, 1977).

2.3. Cultivo de óvulos no fecundados.

Recientes avances en el cultivo de tejidos y en embriogénesis experimental han inducido exitosamente plantas haploides por cultivo de ovarios u óvulos no fecundados. De esta manera no sólo las microsporas, sino también las megasporas y el gametofito femenino de angiospermas, pueden dispora in vitro el desarrollo esporofítico, abriéndose así una nueva vía de investigación genética y de producción de haploides. Además, se le considera una vía alternativa cuando en ciertas especies el cultivo de anteras no tiene éxito o poca respuesta (Yang y Zhou, 1982).

Uchimiya et al. (citado por Rangan, 1982) cultivaron óvu-

los no fecundados de Solanum melongena, obtienen la formación de un vigoroso callo con AIA y Kn, y observan la división de células haploides en el tejido del callo.

Cagnet-Sitbon (citado por Yang y Zhou, 1982) cultivó óvulos en medio MS más 0.5 mg/l de AIA y 2.0 mg/l de Kn, con 3 a 6 % de sacarosa, posteriormente son subcultivados en medio MS modificado con 2.0 mg/l de Kn y 4 a 5 % de sacarosa; mantienen los cultivos a 23°C con intensidad de 500 lux o en la obscuridad, produciendo callo del cual se generan 16 clones: 14 haploides y 2 diploides de Gerbera jamesonii. En cuatro cultivares de G. jamesonii, el porcentaje de callo ginogénico fue de 8 a 17 %, y la regeneración de plántulas fue de 0 a 5%, observando que el genotipo juega un papel importante en el cultivo, ya que responden diferente a la formación de callo; igualmente menciona que los óvulos sólo responden cuando su tamaño es más grande que la mitad de la cavidad del ovario.

Bossoutrot y Hosemans (1985) observaron que la producción de haploides de Beta vulgaris L. por cultivo in vitro de óvulos no fecundados es relativamente eficiente, ya que 46 embriones fueron obtenidos de 1791 óvulos cultivados (2.56%); de estos 17 produjeron planta (36.9%) y de ellas 3 fueron haploides (0.17%). Probaron, además, la producción de líneas homocigotas, necesarias para mejoramiento genético.

2.4. Importancia de la obtención de haploides.

Las células o individuos haploides, son útiles para programas de mejoramiento genético. En plantas superiores es difícil detectar las mutaciones, debido a que los genes en condición recesiva no se expresan en presencia de los alelos dominantes complementarios; los caracteres recesivos sólo podrían ser detectados después de un largo proceso de autofecundación, para tener plantas diploides homocigotas. Las mutaciones en condiciones recesivas se pueden detectar fácilmente en células o plantas haploides, debido a que solo presentan un juego simple de cromosomas. Tanto las células como las plantas haploides con mutaciones específicas pueden formar individuos homocigóticos diploides utilizando colchicina. La obtención de líneas homocigóticas se da con cierta facilidad y en menor tiempo en comparación con los métodos de fitomejoramiento tradicional (Thomas y Davey, 1975).

La inducción de plantas haploides y la diploidización pueden facilitar enormemente los programas de mejoramiento genético tendientes a la fijación de características en híbridos heterocigóticos obtenidos por cruzamiento (Naftalí, 1985).

El uso de células o protoplastos haploides ha permitido la selección de mutantes resistentes a toxinas, salinidad, bajas temperaturas, herbicidas, virus y nemátodos.

te, Arora y Singh (1978bc) obtienen un buen crecimiento del callo en concentraciones de 1 a 10 mg/l de ANA.

Menhi y Hogan (1976) obtienen callo y un buen crecimiento de éste al emplear AIB y 1.0 mg/l de Kn en cultivos de segmentos de tallo.

Medora et al., (1979) obtiene callo de segmentos de tallo utilizando el medio WH modificado en la obscuridad. Prueba el medio WH modificado y el MS sin nitrato de amonio, además, el MS con AIA y Kn, y el MS modificado en la mitad de las concentraciones de los macroelementos con el fin de establecer el mejor medio que induzca el crecimiento de los callos (los cuatro medios contenían 1.8 micromoles /l de 2,4-D). Concluyen que el nitrato de amonio es esencial, y que el medio WH modificado da la mejor respuesta. No encuentra en los medios probados cambios significativos en color, textura, ni diferenciación de brotes o raíces.

Después de probar varios reguladores del crecimiento Pandey y Rajeevan (1983) encuentran que en medio Gamborg (B5) adicionado con 25 micromoles/l de ANA y 10 micromoles/l de Kn, la producción de callo a partir de segmentos de tallo. El callo es de color blanco matizado en verde claro. Al mismo tiempo Rajeevan y Pandey (1983) en medio B5 con 10 micromoles/l de ANA y 5 micromoles/l de Kn obtienen callo friable de color verde claro, en segmentos de tallo, mientras que en segmentos de pe-

ciolo cultivados en medio MS más 0.5 micromoles/l de ANA y 0.5 micromoles/l de BAP obtienen un callo escaso, compacto y de color crema blanquecino.

Utilizando cotiledones, con dos diferentes explantes: lámina media y nervadura central, Litz y Conover (1983) al cultivarlos sobre medio MS al 50% de sus sales minerales, encuentran que el callo obtenido de la nervadura con 0.3 mg/l a 2.0 mg/l de BAP y 0.5 a 3.0 mg/l de ANA, es esponjoso, de color verde claro y se da a la primera semana. Observan que la obtención de callo de la lámina media no se da tan rápido, siendo éste duro y de color verde. El callo de la lámina media lo obtienen en concentraciones de 0.05 a 1.0 mg/l de BAP y 0.2 mg/l de ANA.

Litz y Conover (1980) obtienen buen callo sobre medio MS con 2.2 micromoles/l de BAP y 0.54 micromoles/l de ANA al utilizar porciones de pedúnculo de la especie *C. stipulata* B.

Con el objeto del rescate de embriones de cruzas interespecíficas para la obtención de plantas híbridas, Litz y Conover (1982) cultivan semillas inmaduras de la cruce de *C. papaya* x *C. cauliflora* de 20 a 40 días después de la polinización e inducen la formación de callo en medio WH modificado con 60 g/l de sacarosa, 40 mg/l de glutamina y 20% de endospermo de coco.

Su y Tsay (1985) cultivan anteras sobre medio MS al 50% de sus sales minerales, excepto el complejo del ácido etilendiaminotetracético con sales de fierro y sodio (NaFe EDTA), y adicionando con 2.0 mg/l de ANA y 1.0 mg/l de BAP y 6% de sacarosa, obtienen callo con alta frecuencia de inducción al ser las anteras incubadas en la obscuridad.

Con el fin de realizar posteriores investigaciones sobre la propagación clonal de híbridos entre *C. papaya* L. y otras especies silvestres de *Carica*, Chagolla (1984) obtuvo la metodología para el cultivo in vitro de embriones inmaduros de 30 días después de la polinización vía embriogénesis somática. Obtiene callo en medio MS con 20% de endospermo de coco, 1 mg/l de glutamina, 60 g/l de sacarosa, y diferentes concentraciones de 2,4-D (0.1 mg/l) y ANA (0.5 mg/l).

Al parecer las condiciones óptimas para inducción y crecimiento de callos de papaya son : la presencia de ANA junto con una citocinina, ya sea Kn, 2iP o BAP. Así también los reguladores del crecimiento para la inducción del callo son claramente dependientes de la fuente o naturaleza del explante (Litz, 1984).

2.5.2. Embriogénesis somática.

La inducción de embriones somáticos derivados de callo de segmentos de peciolo de plántula ha sido descrita por De Bruije

(citado por Litz, 1984) y Yie y Liaw (1977). De Bruije reporta que, etapas iniciales del desarrollo embriogénico, son observadas en cultivo de callos, en condiciones de obscuridad. Los embriones así regenerados fueron transferidos a luz y subcultivados a medio WH con 0.01 micromoles/l de BAP, 0.1 micromoles/l de ANA y 20.0 milimoles/l de sacarosa. Yie y Liaw (1977) consiguen la regeneración de embriones somáticos en medio MS que contiene 0.3 micromoles/l de AIA y 4.7 a 9.4 micromoles/l de Kn.

Litz y Conover (1980) obtienen callo de segmentos de pedúnculo y, lo transfieren al mismo medio MS líquido en agitación, pero con 2 micromoles/l de BAP y 1 micromol/l de ANA más 1% de carbón activado por un mes, posteriormente lo dejan de agitar, y es bajo estas condiciones que obtienen la mayor cantidad de embriones somáticos.

Litz y Conover (1981) inducen proembriones en cultivo de semillas inmaduras de *C. papaya* x *C. cauliflora* sobre medio WH con 60 g/l de sacarosa, 400 mg/l de glutamina, 20% de endospermo de coco y diferentes concentraciones de BAP 0.1 a 1.0 mg/l. Litz y Conover (1982), observan competencia embriogénica en la etapa de inducción y crecimiento de callos de semillas inmaduras. La obtención de embriones lo logran en el mismo medio, pero sin endospermo de coco.

Chagolla (1984) obtiene embriogénesis somática en medio MS

pero sin 2,4-D, endospermo de coco y glutamina, y con la mitad de la concentración de sacarosa.

Valencia (1982) utiliza el medio propuesto por Gutiérrez (1982), y prueba diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas para la obtención de callo y su diferenciación en plántulas a partir de embriones maduros de *C. papaya*, con el fin de trasplantar la técnica a embriones híbridos. Obtiene los mejores resultados con ANA (0.25 mg/l) y BAP (0.4 mg/l).

Fernández (1983) con el fin de proliferar y diferenciar callo de embriones híbridos inmaduros de *C. cauliflora* x *C. papaya*, prueba el medio MS, sólido y líquido; normal y diluido; con o sin carbón activado, y en combinación con diferentes reguladores del crecimiento (BAP/ANA, BAP/AIB y ambas con AG₃). No obtiene resultados y menciona se debe a la senescencia de los callos, a niveles de ploidía y a componentes del medio.

2.5.3. Organogénesis.

Brotos adventicios de cultivo de callos son obtenidos por Yie y Liaw (1977) en concentraciones de 0.05 mg/l de AIA y 5.0 mg/l de Kn. Enraizan los brotes con 5 mg/l de AIA. Arora y Singh (1978c) encuentran la proliferación de brotes con 2 mg/l de Kn y 0.2 mg/l de ANA. El enraizamiento lo logran con 0.5 mg/l de ANA y 0.2 mg/l de Kn.

2.5. Cultivo de tejidos vegetales en papaya (Carica papaya L.).

Se ha inducido callo a partir de diferentes segmentos de plántula, de semillas inmaduras, de anteras y de cotiledones, como ruta de propagación vía organogénesis o embriogénesis somática, que permite además obtener variación somaclonal utilizable bajo selección para el mejoramiento del cultivo.

A partir de callos se pueden obtener cultivos celulares en suspensión. De éstos puede hacerse selección de líneas celulares resistentes o tolerantes a condiciones críticas del medio ambiente, o bien, fusión de protoplastos para obtener híbridos somáticos.

2.5.1. Inducción de callo.

De Bruije, citado por Litz (1984), obtiene callo en la obscuridad en medio MS con 1.0 micromoles/l de ANA y 10 micromoles/l de 2iP (isopentenil-adenina), a partir de segmentos de peciolo, registrando un buen crecimiento; mientras que Yie y Liaw (1977), en medio MS con 1.0 mg/l de ANA y 0.1 mg/l de Kn, obtienen callo de segmentos de tallo en condiciones de luz. Arora y Singh (1978a) utilizando segmentos de tallo en medio Linsmaier y Skoog (LS) con 0.5 mg/l de ANA registran una respuesta de proliferación de callo de un 100%, y utilizando 2,4-D para la misma respuesta necesitan una concentración diez veces mayor, mientras que al probar AIA la respuesta es mucho menor. Al probar Kn observan que parece controlar el subsecuente crecimiento del callo, y el AG_3 favorece la proliferación y el crecimiento. Sobre medio MS y LS, y utilizando el mismo explant

Rajeevan y Pandey (1983) registran bajos porcentajes de diferenciación de brotes de callos obtenidos de segmentos de tallo de plántula con 2.5 micromoles/l de ANA y 10 micromoles /l de BAP.

En el mismo año, en cultivos de callos provenientes de cotiledones, Litz et al. (1983) utilizan dos tipos de explantes, lámina media y nervadura central, el primero da un callo duro donde la regeneración de brotes es posible, y el segundo da un callo esponjoso donde no obtienen diferenciación.

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del departamento de Fitoproducción de la Comisión Nacional de Fruticultura.

1. Material vegetal.

El material vegetal utilizado fueron óvulos no fecundados obtenidos de yemas florales que no habían sufrido antesis. Los óvulos de la papaya son anátropos y de funículos bien desarrollados. Las yemas florales fueron colectadas de plantas de papaya (Carica papaya L.) del cultivar "mamey" crecidas en el campo, de un lote experimental del Centro de Desarrollo Frutícola de Huajintlán, Morelos. La plantación contaba con plantas femeninas, hermafroditas y masculinas.

2. Medios de cultivo.

A) Se utilizaron dos medios de cultivo para la inducción de callo (Cuadro 1):

WH) Sales minerales del medio White (1963) suplementado como lo muestra el Cuadro 2.

MS) Sales minerales del medio Murashige & Skoog, con los suplementos orgánicos del Cuadro 2.

Para los dos medios de cultivo, se probó la interacción de diferentes reguladores del crecimiento: AIB/BAP, 2,4-D/Kn, AIB/Kn y 2,4-D/BAP, en concentraciones de 0.0, 0.5 y 5.0 micro moles/l, según lo muestra el Cuadro 3.

B) Para la proliferación del callo se utilizaron las sales minerales del medio MS al 50%, suplementado con: mio-inositol (100 mg/l), tiamina-HCl (0.4 mg/l), sacarosa (15 g/l), más 0.4 mg/l de BAP y 0.25 mg/l de ANA.

C) Con el propósito de lograr la diferenciación del callo se procedió a sembrarlo en dos medios de cultivo:

M1) Se utilizó el mismo medio de la proliferación de callo.

M2) Consistió de las sales minerales del medio MS al 100% excepto: Nitrato de amonio (NH_4NO_3) y Nitrato de potasio (KNO_3), que se usaron al 50%, y los componentes orgánicos que señala el Cuadro 2. (*).

(*) Comunicación personal del Dr. González del CP .

Se probaron 36 combinaciones de ANA/BAP para la diferenciación del callo en los dos medios de cultivo (Cuadro 4).

Todos los medios de cultivo contenían 7.2 g/l de agar. Se ajustó el pH a 5.7 ± 0.1 con NaOH y HCl 1N.

Se utilizaron como recipientes de cultivo, frascos de 100 ml de capacidad con tapas de plástico especiales. Los cultivos fueron esterilizados a una temperatura de 120°C con presión de 1.15 kg/cm^3 durante 15 minutos.

3. Condiciones de incubación.

Para la inducción de callo se probaron (Cuadro 3):

- a) Oscuridad en una incubadora a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- b) Luz en un cuarto de crecimiento a una temperatura de $26 \pm 4^{\circ}\text{C}$, con fotoperíodo de 16 h luz por 8 h de oscuridad, y a una intensidad lumínica de 2000 a 3000 lux.

Para la proliferación y la diferenciación del callo, se mantuvieron los cultivos en el cuarto de crecimiento con las mismas condiciones (inciso b anterior).

Cuadro 1. Constituyentes inorgánicos del medio Murashige & Skoog (1962) y White (1963).

SALES MINERALES		MURASHIGE & SKOOG (MS) mg/l	WHITE (WH) mg/l
MACROELEMENTOS			
Nitrato de Amonio	NH_4NO_3	1650.0	-
Nitrato de Potasio	KNO_3	1900.0	80.0
Cloruro de Calcio Dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.0	-
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.0	720.0
Fosfato de Potasio Monobásico	KH_2PO_4	170.0	-
Fosfato de Sodio Monobásico	NaH_2PO_4	-	15.5
Cloruro de Potasio	KCl	-	65.0
Sulfato de Sodio	Na_2SO_4	-	200.0
Nitrato de Calcio Tetrahidratado	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	300.0
MICROELEMENTOS			
Sal Disódica EDTA	Na_2EDTA	37.3	-
Sulfato Ferroso Heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	-
Sulfato Manganoso Monohidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22.3	7.0
Sulfato de Zinc Heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	3.0
Acido Bórico	H_3BO_3	6.2	1.5
Ioduro de Potasio	KI	0.83	0.75
Molibdato de Sodio Dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	-
Sulfato Cúprico Pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.01
Cloruro de Cobalto Hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	-
Sulfato Férrico	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	-	2.5

Cuadro 2. Componentes orgánicos utilizados en los medios --
de cultivo (mg/l).

COMPONENTES ORGANICOS	M E D I O S			
	INDUCCION MS	DE CALLO WH	DIFERENCIACION M ₁	DIFERENCIACION M ₂
Sacarosa	30	20	30	35
Mio-Inositol	100	100	100	100
Tiamina.HCl	0.4	0.4	0.4	0.4
Glutamina	-	-	-	200
Sulfato de adenina	-	-	-	40

Cuadro 3. Tratamientos para la inducción de callo de óvulos no fecundados de papaya (*Carica papaya* L.).

		LUZ						OSCURIDAD						
		MS			WH			MS			WH			
		AUXINAS												
		0.0	0.5	5.0	0.0	0.5	5.0	0.0	0.5	5.0	0.0	0.5	5.0	
CITOCININAS	BAP	0.0												
		0.5												
		5.0												
	4-D	0.0												
		0.5												
		5.0												
	AIB	0.0												
		0.5												
		5.0												
	Kn	0.0												
		0.5												
		5.0												

Cuadro 4. Diferentes concentraciones de Ac. naftalen-acético y bencil-émino-purina utilizados para la diferenciación de callo de óvulos no fecundados de papaya.

TRATAMIENTO	ANA (MICROMOLES/l)	BAP (MICROMOLES/l)
1	1	1
2	1	2
3	1	3
4	1	5
5	1	10
6	1	15
7	2	1
8	2	2
9	2	3
10	2	5
11	2	10
12	2	15
13	3	1
14	3	2
15	3	3
16	3	5
17	3	10
18	3	15
19	5	1
20	5	2
21	5	3
22	5	5
23	5	10
24	5	15
25	10	1
26	10	2
27	10	3
28	10	5
29	10	10
30	10	15
31	15	1
32	15	2
33	15	3
34	15	5
35	15	10
36	15	15

4. Establecimiento del cultivo.

4.1. Colecta y desinfección del material vegetal.

Se cortaron yemas florales de plantas femeninas y hermafroditas con bisturí, se les eliminó el perianto para obtener el ovario, y fueron colectados en solución de Manzate al 0.1%. Se mantuvieron los ovarios en refrigeración alrededor de 15 h a una temperatura de 4°C, hasta poco antes de ser utilizados.

Los ovarios se lavaron bajo chorro de agua corriente durante 30 minutos con el fin de quitar todo excedente del fungicida. Dentro de la campana de flujo laminar, para garantizar la asepsia, se realizó la desinfección superficial de los ovarios, utilizando una solución de hipoclorito de calcio al 0.5%, con buffer de fosfatos de pH 6 a 6.5, más dos gotas de Tween 20 y agua destilada esterilizada; se mantuvieron en agitación continua durante 15 minutos. Pasado el tiempo se enjuagaron 5 veces con agua destilada esterilizada. Los ovarios desinfectados se mantuvieron dentro de cajas Petri esterilizadas.

4.2. Siembra de óvulos.

Para extraer los óvulos se procedió a cortar longitudinalmente al ovario. Cada parte fué cortada en pedazos más pequeños a medida que se iban sembrando los óvulos con ayuda de una aguja de disección. En algunos casos eran extraídos con todo

y el funículo, y así eran sembrados. La siembra se realizó al azar al igual que la colocación de los frascos en la incubadora y en el cuarto de crecimiento. Se colocaron 5 óvulos por frasco, a razón de dos frascos por tratamiento, es decir, 360 óvulos por relación hormonal, para la inducción de callo.

5. Diferenciación del callo.

Los callos obtenidos, sin importar su procedencia, fueron seccionados en pequeños trozos de 9 mm^2 (aproximadamente 9 mm^3), esto se logro colocando papel milimétrico por debajo del vidrio de trabajo, y fueron sembrados en los dos medios al azar. Se colocaron dos trozos por frasco, cada tratamiento constaba de dos frascos, es decir, 72 frascos por medio.

6. Diseño experimental.

El diseño experimental utilizado para la inducción de callo de óvulos no fecundados fue factorial completamente al azar: 3 (concentraciones de auxinas) x 3 (concentraciones de citocininas) x 2 (medios de cultivo) x 2 (condiciones de incubación) = 36 tratamientos por relación hormonal (AIB/BAP, 2,4-D/Kn, 2,4-D/BAP y AIB/Kn).

La unidad experimental fue de 1 óvulo, con 10 repeticiones por tratamiento, que dan 360 óvulos sembrados por relación hormonal.

7. Análisis de resultados.

La respuesta de inducción de callo fue evaluada a la quinta semana de cultivo. Se observó que la inducción podría ser caracterizada por el grado de desarrollo o crecimiento del callo en el explante. Así, se consideraron las siguientes categorías (los óvulos median aproximadamente 1 mm^2 de área):

s = callo presente sólo en la superficie del óvulo.

m = callo menor a 5 mm^2 .

M = callo mayor a 5 mm^2 .

El análisis estadístico se hizo utilizando el programa GLM (valores no paramétricos) del paquete SAS, para ello se asignaron valores numéricos a los tipos de desarrollo del callo: 1: sin formación de callo, 2: callo sólo en la superficie del óvulo, 3: callo menor a 5 mm^2 y 4: callo mayor a 5 mm^2 , se obtuvo el análisis de varianza y se compararon las medias con la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Inducción de callo.

Con el fin de analizar la influencia de las condiciones de incubación y los componentes necesarios para estimular el desarrollo de callos, se probaron diferentes concentraciones y relaciones de reguladores del crecimiento en dos medios de cultivo, y se trabajaron independientemente.

En general, los porcentajes de contaminación en los cultivos fueron bajos (menos del 10%), sin embargo, para la relación de fitohormonas 2,4-D/BAP la contaminación fué de 100%, por lo que se eliminó para el análisis de respuesta.

La formación de callo se logró desde la segunda a la quinta semana de cultivo, observándose que los óvulos que no desarrollaron callo en éste lapso de tiempo, no respondieron después en los subcultivos.

Los callos obtenidos fueron tanto friables como compactos.

Los obtenidos en la luz (fotoperíodo de 16 h/luz por 8 h de obscuridad) presentaron coloraciones naranja y crema con puntos verdes y blancos. Los obtenidos en la obscuridad fueron de color crema con puntos cafés y blancos.

La inducción de callo, para algunos autores, depende de las condiciones del cultivo empleadas y no de la fuente de material vegetal (Yeoman y Macleod, 1977). Para otros, es una compleja relación entre el material madre usado, la composición del medio y las condiciones ambientales durante el periodo de incubación (Thorpe, 1981). Este trabajo concuerda con lo anterior, como se puede observar (Figura 1), el efecto del AIB y BAP en la formación de callo de óvulos no fecundados, varía en relación con las condiciones de cultivo empleadas: los cultivos que fueron inducidos en condiciones de obscuridad en medio WH presentaron la mayor respuesta de formación de callo (36.6%). En el mismo medio, pero incubados en la luz la respuesta fue de 22.2%. Para el medio MS, los cultivos incubados en la luz presentaron porcentajes mayores de respuesta (26.6%), en comparación con los cultivos incubados en la obscuridad (12.2%).

Esto mismo se observa al ver el efecto del AIB y Kn (Figura 2) donde sin importar las condiciones de incubación empleadas, el medio WH favorece la formación de callo (22.2% para ambos), siendo los callos inducidos en la obscuridad más grandes. En esta combinación de reguladores del crecimiento, el medio MS alcanzó porcentajes mayores de respuesta en la obscuridad (18.8%),

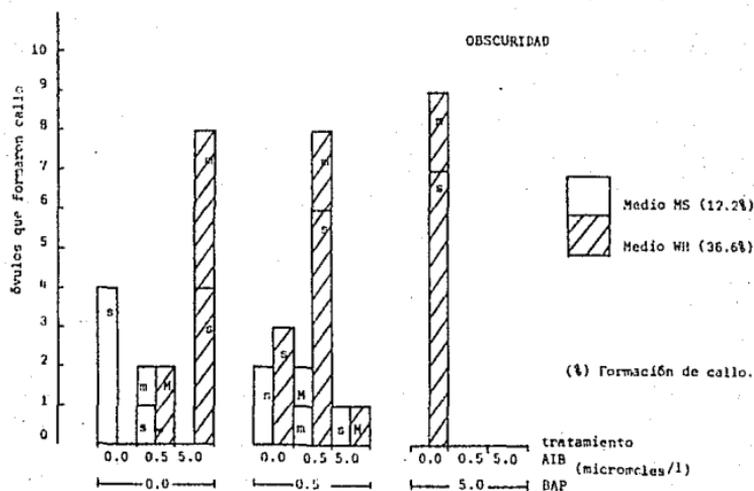
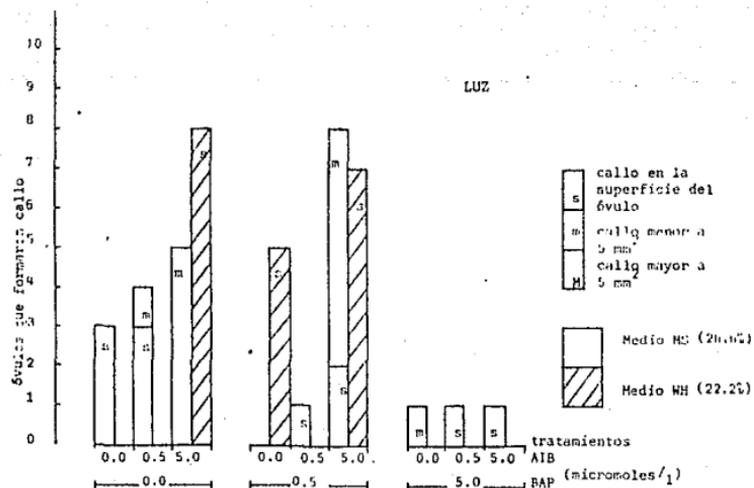


Figura 1. Efecto del ácido-indol-butírico (AIB) y bencil-amino-purina (BAP) en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (*Carica papaya* L.), cultivados en medio Murashige & Skoog (MS) y White (Wh) e incubados en luz y oscuridad.

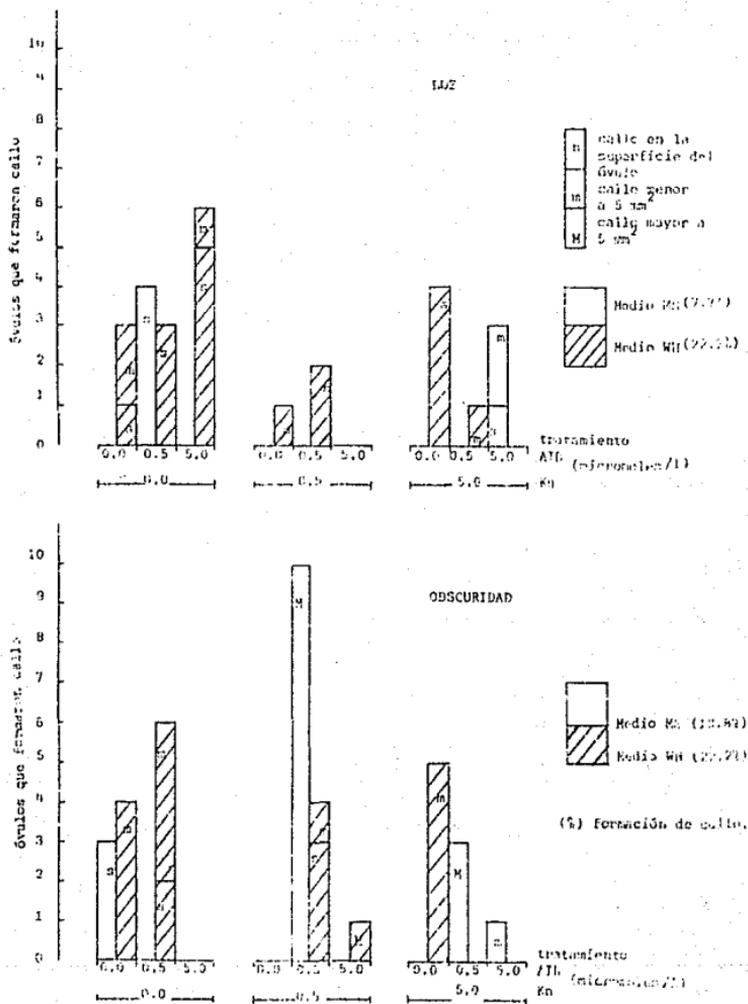


Figura 2. Efecto del ácido-indol-butírico (AIB) y cinetina (Kn) en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (*Carica papaya* L.), cultivados en medio Murashige & Skoog (MS) y White (WH) e incubados en luz y oscuridad.

que los incubados en la luz (7.7%).

En la relación 2,4-D/Kn (Figura 3), se sigue observando que la respuesta está en función de las condiciones de cultivo empleadas. La formación de callo se vió favorecida por el medio WH en ambas condiciones de incubación, en comparación con el medio MS, tanto los cultivos incubados en la luz como en la obscuridad presentaron porcentajes bajos de respuesta (4.4 y 7.7 % respectivamente). Los mayores porcentajes de respuesta se observaron en la obscuridad en medio WH (33.3%).

Con base en los resultados anteriores, se podría mencionar que el comportamiento del desarrollo del callo por efecto de los tratamientos de reguladores del crecimiento en cada una de las relaciones hormonales, no presentan un patrón dado que permita atribuirle a alguna combinación el desarrollo del callo por sí misma, sino más bien, la respuesta esta dada por la interacción de los diferentes factores mencionados. Sin embargo, concentraciones altas de citocininas no favorecen la formación de callo, y los tratamientos con medio WH presentaron mayor frecuencia de formación de callo.

Para detectar el efecto simple y las interacciones de los factores, se procedió al análisis estadístico; se obtuvo el análisis de varianza para cada relación hormonal, y se realizó la prueba de Tukey para ver si había diferencia entre los niveles de cada factor:

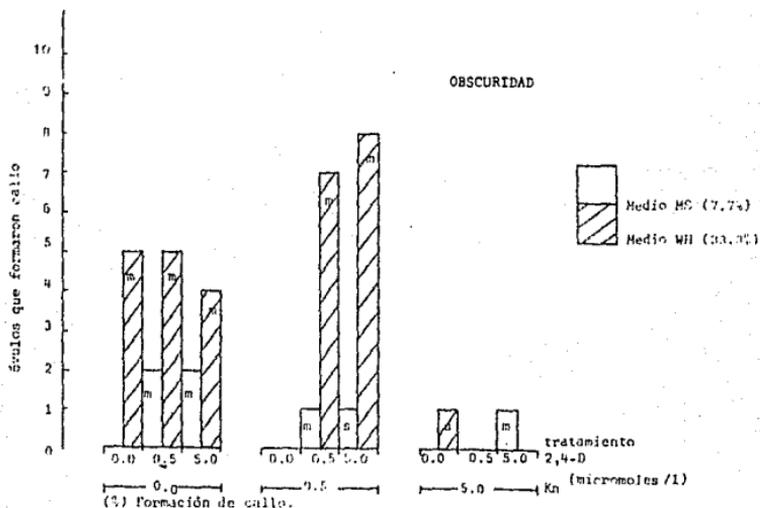
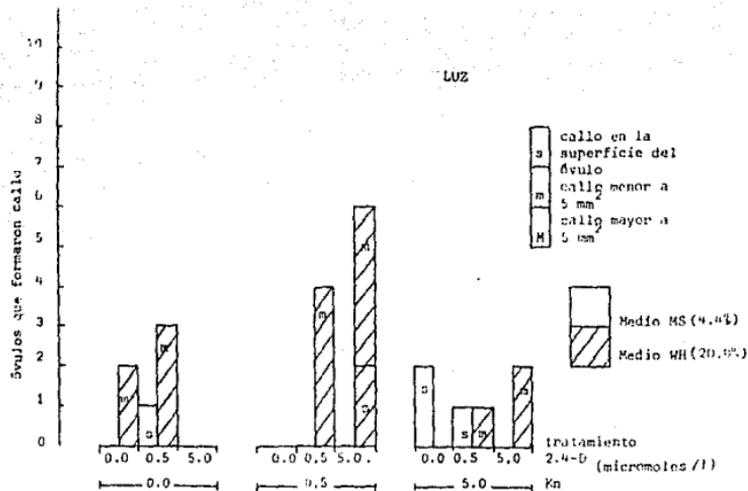


Figura 3. Efecto del ácido 2,4-dicloro-fenoxi-acético y cinetina (Kn) en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (*Carica papaya* L.), cultivados en medio Murashige & Skoog (MS) y White (WH) e incubados en luz y oscuridad.

Cuando se probaron los factores AIB, BAP, MC y CI, el análisis de varianza resultó ser, a excepción de CI, altamente significativo, esto es, que el efecto simple de cada factor interviene en la respuesta obtenida. Sin embargo, cuando se realizó el análisis para determinar la interacción entre los factores, se obtuvo que sólo AIB*MC y AIB*CI no tuvieron efecto, es decir, que el efecto del AIB no depende ni de MC ni de CI (Apéndice 1).

Al aplicar la prueba de Tukey para la variable "tratamientos" (Cuadro 5), se observó que no existe una marcada diferencia entre los tratamientos. Sin embargo, cuando se aplicó ésta prueba, para ver que niveles de cada factor eran significativos en la respuesta, se encontró que, 0.0 y 0.5 micromoles/l de BAP y 5 micromoles/l de AIB dan la mejor respuesta, que la obscuridad no presenta diferencias estadísticas con la luz, y que el medio WH es mejor al MS (Apéndice 4).

Para la relación AIB/Kn, cuando se analizaron los efectos simples de los cuatro factores, se obtuvo que tanto la Kn como CI resultaron ser altamente significativos para la formación de callo, en comparación con AIB y MC que no tuvieron efecto. El análisis de varianza de las interacciones de los factores resultó ser para Kn*AIB, AIB*MC y AIB*CI altamente significativo; y para Kn*MC y Kn*CI fue significativo (Apéndice 2).

Cuadro 5. Efecto de concentraciones del crecimiento (AIB/BAF), medio de cultivo (MS y Luz) y condiciones de incubación (Oz y obscuridad) en la formación de callo de óvulos no fecundados en papaya, cultivadas in vitro.

		0.0		0.5		5.0 AIB (micromoles/l)	
AIB (micromoles/l)	0.0	1 1.3 efghi	2 1.4 cdefghi	5 1.5 cdefghi	6 1.5 fghi	9 3.0 a	10 1.0 i
		3 0.5 i	4 1.0 i	7 1.1 i	8 0.5 abcdefghi	11 1.0 abcdefg	12 2.7 abcde
		13 1.0 i	14 1.2 ghi	17 1.1 i	18 1.8 cdefghi	21 2.5 ab	22 1.1 i
	0.5	15 1.5 bcdefghi	16 1.3 efghi	19 1.0 i	20 2.0 abcdef	23 1.8 abcdefgh	24 2.4 abc
		25 1.1 i	26 1.0 i	29 1.1 i	30 1.0 i	33 1.1 i	34 1.0 i
	5.0	27 1.0 i	28 2.1 abcd	31 1.0 i	32 1.0 i	35 1.0 i	36 1.0 i

☒ MS/Obs.

☐ MS/Luz

☒ WII/Obs.

☒ WII/Luz

Valores con la misma letra son iguales estadísticamente según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Cuando se realizó la prueba de Tukey para la variable "tratamientos" (Cuadro 6), el tratamiento 18 resultó ser el mejor, el cual se obtuvo en condiciones de obscuridad en medio de cultivo MS, y en concentraciones de 0.5 micromoles/l de AIB y Kn.

En la prueba de Tukey los niveles de Kn resultaron no tener efecto, no así los niveles de AIB donde 0.5 micromoles/l resultó el mejor. El efecto de los dos medios de cultivo resultó ser igual estadísticamente, mientras que en condiciones de incubación la obscuridad resultó ser mejor (Apéndice, 5).

El análisis para la relación 2,4-D resultó ser para cada factor, en su efecto simple y en sus interacciones, altamente significativo, a excepción de 2,4-D*MC y 2,4-D*CI que no tuvieron efecto (Apéndice 3).

En el análisis para "tratamientos" no se observó que exista una marcada diferencia entre los tratamientos (Cuadro 7). Sin embargo, según la prueba de Tukey para cada factor, 0.0 y 0.5 micromoles/l de Kn y, 0.5 y 5.0 micromoles/l de 2,4-D resultaron ser mejores para la inducción de callo. El factor medio de cultivo presentó diferencias entre sus niveles, mientras que para condiciones de incubación, aquí también la obscuridad resultó ser mejor al igual

Cuadro 6. Efecto de concentraciones del crecimiento (AIB/Kn), medios de cultivo (MS y MH) y condiciones de incubación (Luz y oscuridad) en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya, cultivados in vitro.

		AIB (micromoles/l)					
		0,0		0,5		5,0	
Kn (micromoles/l)	0,0	1 1,0 e	2 1,3 cdu	5 1,4 cde	6 -	9 1,0 e	10 1,0 e
		3 1,5 cde	4 1,8 bcd	7 1,3 cde	8 1,2 b	11 1,7 bc	12 1,0
	0,5	13 1,0 e	14 1,0 e	17 1,0 e	18 1,0 a	21 1,0 e	22 1,0 e
		15 1,2 cde	16 1,0 e	19 1,2 cde	20 1,5 cde	23 1,0 e	24 1,4 cde
	5,0	25 1,0 e	26 1,0 e	29 1,0 e	30 1,9 cde	33 2,0 e	34 -
		27 1,4 cde	28 3,0 d	31 1,2 cde	32 1,0 e	35 1,2 cde	36 1,0 e

MS/Obs.

MS/Luz

MH/Obs.

MH/Luz

Valores con la misma letra son iguales estadísticamente según prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Cuadro 7. Efecto de la concentración del crecimiento (2,4-D/Kn), saldos de cultivo (HS y WH) y condiciones de incubación (Luz y oscuridad) en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya, cultivados in vitro.

2,4-D (micromoles/l)

		0.0		0.5		5.0	
Kn (micromoles/l)	0.0	1. 1.0 d	2. 1.0 d	5. 1.1 cd	6. 1.4 bcd	9. 1.0 d	10. 1.4 bcd
	0.5	3. 1.4 bcd	4. 2.0 abc	7. 2.0 abcd	8. 2.0 abcd	11. 1.0 d	12. 1.9 abcd
	1.0	13. 1.0 d	14. 1.0 d	17. 1.0 d	18. 1.2 cd	21. 1.0 d	22. 1.2 cd
0.5	1.5	15. 1.0 d	16. 1.2 cd	19. 1.0 abcd	20. 2.0 a	23. 2.0 d	24. 2.0 d
	2.0	25. 1.2 bcd	26. 1.0 d	29. 1.1 cd	30. 1.0 d	33. 1.0 d	34. 1.4 abcd
	5.0	27. 1.0 d	28. 1.1 cd	31. 1.2 cd	32. 1.0 d	35. 1.4 d	36. 1.0 d

HS/Obs.

HS/Luz

WH/Obs.

WH/Luz

Valores con la misma letra son iguales estadísticamente según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

que el medio WH (Apéndice 6).

A lo anterior, en papaya se han utilizado diferentes explantes para la inducción de callo, han reportado que las auxinas son críticamente requeridas para la iniciación y el subsecuente crecimiento del callo (Arora y Singh, 1978a). Por otro lado, Pandey y Rajeevan (1983) junto con otros autores, concuerdan que altos niveles de citocininas son necesarias para la iniciación y crecimiento del callo.

En este trabajo, se observó que las auxinas son necesarias para la iniciación de callo de óvulos no fecundados de papaya, mientras que las citocininas, si bien las diferentes concentraciones probadas resultaron ser iguales estadísticamente con el nivel "0.0", la concentración de 0.5 micromoles/l en combinación con las diferentes auxinas en concentraciones de 0.5 y 5.0 micromoles/l, proporcionaron la mejor respuesta en la formación de callo.

Así mismo se probaron diferentes combinaciones de fitohormonas con el fin de inducir callo; las citocininas probadas, Kn y BAP han sido utilizadas con este objetivo en diferentes explantes de papaya con buenos resultados (Yie y Liqw, 1977; Pandey y Rajeevan, 1983; Rajeevan y Pandey, 1983; Litz y Conover, 1980; Litz y Conover, 1983 y Su y Tsay, 1985), básicamente en rangos de 0.5 a 5.0 micromoles/l, lo que concuerda

con ésta investigación. El ácido naftalen-acético, dentro del grupo de las auxinas, es la hormona más utilizada junto con las citocininas mencionadas para la inducción de callo; sin embargo, en éste trabajo se plantó utilizar otras auxinas, ya que, en pruebas preelminares los explantes no respondieron. Las auxinas utilizadas 2,4-D y AIB, han sido reportadas en algunos trabajos con buenos resultados (Menhi y Hogan, 1976; Arora y Singh, 1977; Medora et al., 1979; Chagolla, 1984), básicamente en concentraciones de 5.0 micromoles/l de AIB y 0.5 micromoles/l de 2,4-D, lo cual concuerda con nuestros resultados. Es importante mencionar que las combinaciones de reguladores del crecimiento empleadas como tales, no han sido utilizadas para otros explantes, ha excepción del reporte de Menhi y Hogan (1976) quienes utilizaron AIB y Kn. No obstante, el haber utilizado estas combinaciones permitió analizar la inducción de callo en un explante que hasta el momento no había sido probado.

Para medios de cultivo, el medio MS ha sido utilizado con buen éxito para el cultivo de tejidos vegetales, y esto es en parte atribuido a sus altas concentraciones de sales (Staba, 1980). En papaya, tanto el medio MS normal como el diluido en sus sales y el medio WH, han sido utilizados para la inducción de callo, y han proporcionado buenos resultados (Litz, 1984).

En esta investigación tanto el medio MS como el WH propor-

cionaron la inducción de callo, sin embargo, el medio WH se vio favorecido en la respuesta cuando los cultivos que lo contenían eran incubados en la obscuridad, además de presentar, en general, mejor desarrollo de los callos. Junto a esto, el medio WH por sus características de concentraciones bajas de sales, proporciona ventajas desde el punto de vista económico.

Con lo que respecta a las condiciones de incubación, los cultivos de callo son generalmente mantenidos en obscuridad (Staba, 1980). Skirvin (1981) menciona que callos de mora crecen únicamente en la obscuridad, y en cultivares de manzano reporta que unos crecen mejor en la obscuridad, otros crecen en luz o en obscuridad, y otros no responden a la luz de 0 a 3358 lux, pero 7800 lux estimula un crecimiento lento. Yang y Zhou (1982) obtienen callo de óvulos de Gerbera jamesonii con baja intensidad lumínica.

En papaya el cultivo de callos de diferentes explantes se ha iniciado tanto en luz como en la obscuridad. En esta investigación la obscuridad favoreció la formación de callo. Al igual que el medio WH, la obscuridad representa ventajas económicas para la iniciación y mantenimiento de cultivo de callos de óvulos no fecundados de papaya.

Thorpe (1978) aclara que los requerimientos que se tengan de reguladores del crecimiento e incluso de los demás factores

pueden variar de una especie a otra y de un tipo de tejido a otro, así como del estado fisiológico del explante mismo y que este estado está determinado por las condiciones intrínsecas de la planta donadora, como método de cultivo, condiciones hídricas, edad, etc.

Al respecto, Skirvín (1981) menciona que las concentraciones de reguladores del crecimiento usadas para cultivo de tejidos en frutales varían considerablemente de reporte en reporte, aparentemente no hay una concentración óptima para cada especie en cada medio de cultivo. Así también, diferentes órganos pueden responder a constituyentes del medio en varias formas dando diferentes resultados.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo y en base a lo anterior, nos indican que los requerimientos necesarios para la inducción de callo in vitro de óvulos no fecundados de papaya, es una compleja relación entre medios de cultivo, tipos y concentraciones de reguladores del crecimiento, condiciones de incubación y de la fuente de material vegetal.

Se pudo observar que el material vegetal utilizado presentaba alta heterogeneidad fisiológica, ya que óvulos del mismo ovario se comportaron diferente aun en el mismo tratamiento.

2. Diferenciación del callo.

La diferenciación de los callos no se presentó en ninguno de los tratamientos probado con ANA/BAP en ambos medios de cultivo. Se observó que a medida que se subcultivaron los callos la coloración cambió de naranja y crema con puntos verdes y blancos a tonos crema, así también el crecimiento fué, en general, mínimo en estas condiciones.

Al respecto Yie y Liaw (1977) reportaron que callos blancos de tejidos de plántula que presentaron protuberancias verdes, regeneraron brotes. Litz y Conover (1982) mencionan que en explantes de cotiledones que formaron callo, los de consistencia friable que presentaron un crecimiento rápido no regeneraron brotes ni raíces adventicias, en comparación con los compactos de color verde que aunque presentaron crecimiento lento, regeneraron brotes en bajas concentraciones de ANA/BAP. Estos mismos reguladores han sido utilizados para diferenciar callo de segmentos de tallo en bajos porcentajes (Rajeevan y Pandey, 1983). Por otro lado, existen reportes en donde no logran la diferenciación del callo, en el mismo explante, al someterlo a varios medios de cultivo (Medora et al., 1979).

A parte de la diferenciación de callos de papaya vía organogénesis, se reportar la embriogénesis somática (Yie y Liaw, 1977; Litz y Conover, 1980; Litz y Conover, 1981a; Litz y Conover, 1982; De Bruije, citado por Litz, 1984 y Chagolla, 1984),

y en general es obtenida en concentraciones bajas de ANA y BAP.

Como se mencionó, los requerimientos que se tengan de reguladores del crecimiento e incluso de los demás factores puede variar de una especie a otra y de un tejido a otro. Por lo que en éste caso pensamos que el tipo de explante, por sus características inherentes, no se comporta como los otros explantes utilizados (tejidos de plántulas, anteras, semillas inmaduras, embriones, etc.) a los tratamientos con el ácido naftalen-acético y bencil-amino-purina

CONCLUSIONES

. La formación de callo se observó de la segunda a la quinta semana de cultivo; después de éste periodo los óvulos ya no respondieron a los subcultivos.

. La formación de callo se consideró baja para todos las relaciones de reguladores del crecimiento probadas. La mayor parte de los óvulos que respondieron presentaron formación de callo mínima sobre su superficie, seguido de los que produjeron callo menor a 5 mm^2 .

. Para la relación AIB/BAP los mejores tratamientos para la formación de callo se encontraron en los niveles de 5.0 micromoles/l de AIB y 0.0 y 0.5 micromoles/l de BAP, en medio WH e incubados en la luz como en la obscuridad.

. En la relación AIB/Kn la respuesta se ve favorecida por 0.5 micromoles/l de AIB y 0.0 y 0.5 micromoles/l de Kn, en medio MS como en WH y en la obscuridad.

. Para 2,4-D/Kn la mejor respuesta se obtuvo con 0.5 y 5.0 micromoles/l de 2,4-D y 0.5 micromoles/l de Kn, en medio WH e incubados en la obscuridad.

. El mejor tratamiento de todas las relaciones de fitoreguladores fué: 0.5 micromoles/l de AIB y 0.5 micromoles/l de Kn cultivados en medio MS e incubados en condiciones de obscuri

dad, dichos callos se caracterizaron por ser grandes y de consistencia friable.

. Se concluye que la respuesta de formación de callo de óvulos no fecundados de papaya, estuvo influida por los diferentes factores : tipos y concentraciones de reguladores del crecimiento, medios de cultivo, condiciones de incubación y el material madre utilizado.

. Las auxinas y las citocininas fueron necesarias para la inducción de callo, y que éstas, en determinadas concentraciones provocaron diferentes respuestas en medios y condiciones de incubación distintos, así también, la respuesta se ve favorecida por el medio WH en condiciones de obscuridad, lo cual presenta ventajas económicas.

. La diferenciación de los callos utilizando ANA/BAP en diferentes concentraciones y en los dos medios empleados no se observó, y esto es quizá a las características inherentes del explante utilizado.

. Por lo que se recomienda para posteriores investigaciones con el mismo objetivo:

*Probar diferentes estados de desarrollo de la yema en relación a la respuesta de los óvulos en cultivo in vitro.

*Realizar siembras a lo largo del año para determinar si la época influye en la respuesta.

*Enriquecer el medio de cultivo con componentes orgánicos

que favorezcan la división celular, como la glutamina, para el crecimiento de los callos.

*Bajo las condiciones de cultivo anteriores probar tipos y concentraciones de reguladores del crecimiento para la inducción de callo, estas serían: ANA y AIB (auxinas) con Kn y BAP (citocininas) en concentraciones de 0.5-5.0 micromoles/l y 0.0-0.5 micromoles/l respectivamente. Y el 2,4-D en concentraciones de 0.5-2.0 micromoles/l.

*Para la diferenciación del callo probar medios líquidos y sólidos para inducir la embriogénesis somática, incluyendo al medio altas concentraciones de sacarosa y probando concentraciones de ANA/BAP y AIA/Kn, que han sido reportadas para la inducción de embriones.

BIBLIOGRAFIA

- Aitchison, P.A., A.J. Macleod y M.M. Yeoman. 1977. Growth patterns in tissue (callus) culture. In: Plant tissue culture and cell culture. Street, H.E. (Ed). Blackwell Scientific Publications. England, 276-306p.
- Alonso, O.R. 1953. Observaciones sobre el cultivo y mejoramiento de la fruta bomba (Carica papaya L.). Estación Exp. Agro. No. 67. La Habana, pp. 157.
- Allan, P. 1964. Papaw growth from cutting. Farming in South Africa, 39(11): 34-40.
- Arora, I.K. y N.R. Singh. 1978a. In vitro plant regeneration in papaya. Curr. Sci. 47(22):857-858.
- _____. 1978b. Callus initiation in the propagation of papaya (Carica papaya L.) in vitro Journal of Horticultural Science, 53:151.
- _____. 1978c. Growth hormones in vitro callus formation of papaya. Scientia Horticulturae, 8:357-361.
- Badillo, M.V. 1971. Monografía de la familia Caricaceae. Univ. Central de Venezuela, Maracay, 216p.
- Bossoutrot, D. y D. Hosemans. 1985. Gynogenesis in Beta vulgaris L. from in vitro culture of unpollinated ovules to the production of doubled haploid plant in soil. Plant Cell Report. 4:300-303.
- Chagolla, N.J.G. 1984. Embriogénesis somática en embriones inmaduros de papaya (Carica papaya L.) var. Cera cultivados in vitro. Tesis de Licenciatura. UACH. México, 55p.
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plant. Columbia Univ. Press. New York, 143p.
- De Fossard, R. 1977. Tissue culture from plant propagators. Univ. New England Printery, Australia. 40p.
- Fernández, G.O.C. 1983. Desarrollo y posible diferenciación de callos de

- embriones híbridos inmaduros de Carica cauliflora J. x Carica papaya L. Tesis de Licenciatura. UNAM. Escuela de Estudios Profesionales, Iztacala, México.
- Guevara, G.A. 1986. Etapas iniciales en la propagación clonal in vitro de Carica papaya L. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana, México. 69p.
- Gutiérrez, M.M. 1982. Cultivo in vitro de embriones maduros de Carica papaya L. Tesis UAEM. Fac. de Ciencias Químicas. Toluca, Méx.
- Ibar, L. 1979. Cultivo del aguacate, chirimoya, mango y papaya. ED. AEDOS. 1a. edición. Barcelona, España.
- Jiménez, H. 1957. Injertos entre especies de Carica. Agro. Trop., 7:33-37.
- Lange, A.H. 1960. Factors affecting sex changes in the flowers of Carica papaya L. Amer. Soc. Hort.Sci., 77(5):253-263.
- Litz, R.E. 1984. The papaya. In: Handbook of plant cell culture tissue and cells. Crop Species. Sharp, W.R. et al. Macmillan Publishing Company, London, 2:349-368.
- Litz, R.E. y R. Conover. 1980. Somatic embryogenesis in cell culture of Carica stipulata B. HortScience, 15(6):733-735.
- _____ . 1981. In vitro polyembryony in Carica papaya L. ovules. Z.Pflanzenphysiol, 104:285-288.
- _____ . 1982. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration from Carica papaya L. ovular callus. Plant Science Letters, 26:153-158.
- Litz, R.E., S.K.O'Hair y R.A.Conover. 1983. In vitro growth of Carica papaya L. cotyledons. Scientia Horticulturae, 19:287-293.
- Medora, R., E.D.Bilderback y P.G.Mell. 1979. Efecto of media on growth of papaya callus. Z. Pflanzenphysiol, 91:79-82.
- Menhi, A.A. y L.Hogan. 1976. Tissue culture of C. papaya. HortScience, 11:311 (abstracts).
- Moreno, P. 1980. Caricaceae. Flora de Veracruz, 10:1-17.
- Murashige, T. y F.Skoog. 1962. A revised medium from rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 5:473-497.
- Murashige, T. 1979. Plant tissue culture and its importance to agriculture. In: Practical Tissue Culture Applications. Maramorosch, K. and H. Hirumi (Ed). Academic Press. New York, 27-43p.

- Naftalí, O. 1985. Tipos y aplicaciones de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales. En: Curso teórico-práctico de cultivo de tejidos vegetales. Vallalobos, A.V. (ed). Centro de Genética, Colegio de Postgraduados. México.
- Ochse, J.J., M.S. Soule, M.S. Dijkman y C. Wehlburg. 1976. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Limusa, México. p.652-660.
- Pandey, R.M. y M.S. Rajeevan. 1983. Callus initiation and regeneration in tissue culture of papaya. In: Plant Cell Culture in Crop Improvement. Sen, S.K. and L.G. Kenneth (Ed). Plenum Press. New York, p:427-430.
- Rajeevan, R.M. y R.M. Pandey. 1983. Propagation of papaya tissue culture. Acta Horticulture, 131:131-139.
- Rangan, T.S. 1982. Ovary, ovule y neucellus culture, In: Experimental embryology of vascular plants, Springer-Verlag.
- Reinert, J. y P.S. Bajaaj. 1977. Plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, U.S.A. 803p.
- SARH, 1983. El papayo, En: Logros y aportaciones de la investigación agrícola en el estado de Veracruz. INIA. 34-36p.
- Samson, J.A. 1986. Tropical fruits. 2a. ed. Tropical Agriculture Series. Longman Scientific & Technical. 335p.
- Skirvin, R.M. 1981. Fruit crops. In: Cloning agricultural plants via in vitro technique, Conge, B.V. (Ed). CRC press, Boca Raton, Florida. p:51-54.
- Staba, E.J. 1980. Plant tissue culture as a source of biochemicals. p:2-11.
- Storey, W.B. 1937. The primary flower types of papaya and the fruits types that develop from them. PromAmer.Soc.Hort.Sci., 35:80-82.
- Su, C.Y. y H.S. Tsay. 1985. Anther culture of papaya (Carica papaya L.). In: Tissue culture in forestry and agriculture, Henke, R.R. et al. (Ed). Plenum, Press. New York. p:357.
- Thorpe, T.A. 1978. Regulation of organogenesis in vitro. In: Propagation of higher plant through tissue culture: a bridge between research and application. Univ. of Tennessee Symp. Proc. April 16-19. Knoxville, Tn. 87-101.
- _____. 1981. Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture. Academic Press, Inc. London, 373 p.
- Thomas, E. y R.E. Davey. 1975. From single cells to plants. The Wykham. Science Series. London. 90-95p.

- Traub, H.P. y C. Marshall. 1937. Rooting of papaya cuttings. Am. Soc. Hor. Sci., 34:291-294.
- Valencia, S.P.R. 1983. Micropropagación in vitro de embriones de Carica papaya L. Tesis, UNAM, Fac. de Ciencias, México.
- White, P.R. 1963. The cultivation of animal and plant cell. The Ronald Press Co., New York.
- Yang, H.V. y C. Zhou. 1982. In vitro induction of haploide plants from unpollinated ovaries and ovules. Theor. Appl. Genet., 63:97-104.
- Yeoman, M.M. y A.J. Macleod. 1977. Tissue (callus) culture-techniques. In: Plant tissue and cell culture. Street, H.E. (Ed). Blackwell Scientific Publications, England. p:31-60.
- Yie, S.T. y S.I. Liaw. 1977. Plant regeneration from shoot tips and callus of papaya. In vitro, 13(9):564-567.

A P E N D I C E S

Apéndice 1.

Análisis de varianza para los factores AIB, BAP, medios de cultivo y condiciones de incubación en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (Carica papaya L.) cultivados in vitro.

FUENTE	GL	SC	CM	F	Pr>F
BAP	2	160066.0427	80033.0213	21.08	0.0001 **
AIB	2	68961.3962	34480.6981	9.08	0.0001 **
M.Cultivo	1	45865.5759	45865.5759	12.08	0.0006 **
C.Incubación	1	1727.8103	1727.8103	0.46	0.5004 ns
BAP*AIB	4	122213.5926	30553.3982	8.05	0.0001 **
BAP*M.Cultivo	2	24404.7946	12202.3973	3.21	0.0416 *
BAP*C.Incubación	2	17366.9032	8683.4516	2.29	0.1033 ns
AIB*M.Cultivo	2	4448.4042	2224.2021	0.59	0.5572 ns
AIB*C.Incubación	2	80525.6060	40262.8030	10.61	0.0001 **
Error	295	1119843.8742	3796.0809		
Total	313	1645424.0000			

* significativo

** muy significativo

ns no significativo

Apéndice 2.

Análisis de varianza para los factores AIB, Kn, Medios de cultivo y condiciones de incubación en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (*Carica papaya* L.) cultivados in vitro.

FUENTE	GL	SC	CM	F	Pr>F
Kn	2	8951.0128	4475.5064	1.50	0.2243 ns
AIB	2	65076.4736	32538.2368	10.92	0.0001 **
M.Cultivo	1	10939.7639	10939.7639	3.67	0.0563 ns
C.Incubación	1	34552.8486	34552.8486	11.60	0.0008 **
Kn*AIB	4	59663.8046	14915.9511	5.01	0.0006 **
Kn*M.Cultivo	2	24377.5983	12188.7991	4.09	0.0177 *
Kn*C.Incubación	2	20284.8556	10142.4278	3.41	0.0345 *
AIB*M.Cultivo	2	48319.9171	24159.9585	8.11	0.0004 **
AIB*C.Incubación	2	100156.9794	50078.4897	16.81	0.0001 **
Error	291	866736.7461	2978.4768		
Total	309	1239060.0000			

** muy significativo

* significativo

ns no significativo

Apéndice 3.

Análisis de varianza para los factores 2,4-D, Kn, medios de cultivo y condiciones de incubación en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (Carica papaya L.) cultivados in vitro.

FUENTE	GL	SC	CM	F	Pr>F
Kn	2	55583.3893	27791.6947	8.94	0.0002 **
2,4-D	2	31020.9642	15510.4821	4.99	0.0073 **
M.Cultivo	1	140778.3025	140778.3025	45.30	0.0001 **
C.Incubación	1	18163.4225	18163.4225	5.84	0.0162 **
Kn*2,4-D	4	58719.5338	14679.8835	4.72	0.0001 **
Kn*M.Cultivo	2	72700.3308	36350.1654	11.70	0.0001 **
2,4-D*M.Cultivo	2	11187.8580	5593.9290	1.80	0.1670 ns
Kn*C.Incubación	2	30588.3459	15294.1729	4.92	0.0079 **
2,4-D*C.Incubación	2	6293.4605	3146.7302	1.01	0.3644 ns
Error	319	991309.3924	3107.5530		
Total	337	1416345.0000			

muy significativo (**)

(ns) no significativo

Apéndice 4.

Prueba de Tukey para los factores AIB, BAP, medios de cultivo (MC) y condiciones de incubación (CI) en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (Carica papaya L.).

COMPARACION BAP	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	SIGNIFICANCIA	GRUPO TUKEY
0.5 y 0.0	9.237	ns	
0.5 y 5.0	51.068	**	0.5 a
0.0 y 0.5	-9.237	ns	
0.0 y 5.0	41.831	**	0.0 a
5.0 y 0.5	-51.068	**	5.0 b
5.0 y 0.0	41.831	**	
AIB			
5.0 y 0.0	34.006	**	
5.0 y 0.5	34.564	**	5.0 a
0.0 y 5.0	-34.006	**	
0.0 y 0.5	0.558	ns	0.0 b
0.5 y 5.0	-34.564	**	
0.5 y 0.0	- 0.558	ns	0.5 b
Nivel de confianza = 0.95 GL = 295 CME = 3796.081			
Rango estudentizado del valor crítico = 3.331			
COMPARACION MC	MEDIA	POBLACION	GRUPO TUKEY
WHITE	170.279	145	a
MURASHIGE & SKOOG	146.539	169	a
($\alpha = 0.05$)	DMS = 13.726		
COMPARACION CI	MEDIA	POBLACION	GRUPO TUKEY
LUZ	158.778	144	a
OSCURIDAD	156.418	170	b
($\alpha = 0.05$)	DMS = 13.733		

** significativo
ns no significativo

Apéndice 5.

Prueba de Tukey para los factores AIB, Kn, medios de cultivo (MC) y condiciones de incubación (CI) en la formación de callo de óvulos no fecundados de papaya (Carica papaya L.).

COMPARACION AIB	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	SIGNIFICANCIA	GRUPO TUKEY
0.5 y 0.0	21.609	**	
0.5 y 5.0	33.788	**	0.5 a
0.0 y 0.5	-21.609	**	
0.0 y 5.0	12.79	ns	0.0 b
5.0 y 0.5	-33.788	**	
5.0 y 0.0	-12.179	ns	5.0 b
Kn			
0.0 y 5.0	10.71	ns	
0.0 y 0.5	11.657	ns	0.0 a
5.0 y 0.0	-10.791	ns	
5.0 y 0.5	0.867	ns	5.0 a
0.5 y 0.0	-11.657	ns	
0.5 y 5.0	- 0.867	ns	0.5 a
Nivel de confianza = 0.95		GL = 291	CME = 2978.477
Rango estudentizado del valor crítico = 3.332			

COMPARACION MC	MEDIA	POBLACION	GRUPO TUKEY
WHITE	160.386	167	a
MURASHIGE & SKOOG	149.794	143	a
($\alpha = 0.05$)	DMS = 12.238		

COMPARACION CI	MEDIA	POBLACION	GRUPO TUKEY
OBSCURIDAD	167.772	136	a
LUZ	145.908	147	b
($\alpha = 0.05$)	DMS = 12.294		

** significativo
ns no significativo

Apéndice 6.- Prueba de Tukey para los factores 2,4-D, Kn, condiciones de incubación (CI) y medios de cultivo (MC) en la formación de callos de óvulos no fecundados de papaya (C. papaya L.).

COMPARACION 2,4-D	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	SIGNIFICANCIA	GRUPO TUKEY
0.5 y 5.0	0.996	ns	
0.5 y 0.0	20.464	+++	0.5 a
5.0 y 0.5	-0.996	ns	
5.0 y 0.0	19.468	+++	5.0 a
0.0 y 0.5	-20.464	+++	
0.0 y 5.0	-19.468	+++	0.0 b

COMPARACION Kn	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	SIGNIFICANCIA	GRUPO TUKEY
0.5 y 0.0	4.785	ns	
0.5 y 5.0	29.470	+++	0.5 a
0.0 y 0.5	-4.785	ns	
0.0 y 5.0	24.686	+++	0.0 a
5.0 y 0.5	-29.470	+++	
5.0 y 0.0	-24.686	+++	5.0 b

Nivel de confianza = 0.95 GL = 319 CME = 3107.553

Rango estudentizado del valor crítico = 3.330

COMPARACION MC	MEDIA	POBLACION	GRUPO TUKEY
WHITE	190.736	163	a
MURASHIGE & SKOOG	140.720	175	b
($\alpha = 0.05$)	DMS = 11.939		

COMPARACION CI	MEDIA	POBLACION	GRUPO TUKEY
OSCURIDAD	177.823	175	a
LUI	160.564	163	b

($\alpha = 0.5$) DMS = 11.939

FE DE ERRATAS

PAGINA	REGLON	DICE	DEBE DECIR
v	15	fitoreguladores	fitorreguladores
2	1	carancia	carencia
2	6	resistentes	recientes
4	5	debió a	debió a la
16	15	quierscente	quiescente
18	11	porcdntaje	porcentaje
19	4	detectas	detectar
29	2	mediso	medios
29	12	cuato	cuarto
33	14	destilidad	destilada
47	20	Liqw	Liaw
48	4	plantó	planteó
51	21	diferenciación	diferenciación
51	22	reportar	reporta
53	19	fitoreguladores	fitorreguladores

TESIS TEM
Sistemas de Reproducción Gráfica



Tel. 658-70-48